

薇甘菊化感活性成分的分离与鉴定

李拥军^{1,2}, 陈 实¹, 李春远¹, 邓思娟¹, 谷文祥¹

(1 华南农业大学 理学院, 广东 广州 510642; 2 中山市农产品质量监督检验检测中心, 广东 中山 528403)

摘要:采用生物活性跟踪法,对薇甘菊 *Mikania micrantha* 地上部化感活性成分进行分离,鉴定了3个化合物,他们分别是 α -香树脂醇、豆甾醇和阿魏酸. 对此3种单体的化感作用活性研究表明:阿魏酸和 α -香树脂醇在1.00、0.50和0.25 mg/mL 3种质量浓度下,对萝卜、菜心和水稻3种受体的抑制作用均达到了显著水平.

关键词:薇甘菊; 化感物质; 分离与鉴定

中图分类号:S651

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2008)04-0026-05

Isolation and Identification of Allelochemicals from *Mikania micrantha*

LI Yong-jun^{1,2}, CHEN Shi¹, LI Chun-yuan¹, DENG Si-juan¹, GU Wen-xiang¹

(1 College of Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Zhongshan Quality Supervision & Test Center of Agricultural Products, Zhongshan 528403, China)

Abstract: Three allelochemicals were isolated from aerial parts of *Mikania micrantha* by repeated silica gel column chromatography combined with bioassay method. Their structures were identified as α -amyrin, stigmasterol and ferulic acid by spectroscopic analysis (IR, EI-MS, ¹HNMR, ¹³CNMR). The α -amyrin and ferulic acid had highly inhibitory effects on the seedling growth of *Raphanus sativus*, *Brassica campestris* and *Oryza sativa* at 1 000, 500 and 250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively.

Key words: *Mikania micrantha*; allelochemicals; isolation and identification

薇甘菊学名小花假泽兰 *Mikania micrantha*, 为菊科假泽兰属植物, 近年来成为广东省危害经济作物和森林植被的主要害草. 薇甘菊所到之处, 本地植物被其攀缘、缠绕或覆盖, 难以进行光合作用, 可因饥饿而死, 或是被重压、绞杀而死, 或是薇甘菊通过释放化感物质将其他植物杀死, 因而薇甘菊被称为“植物杀手”, 是最具危害性且繁殖速度很快的恶性杂草之一^[1]. 前人对薇甘菊的化感作用研究已经做了大量的工作, 证明具有化感活性物质存在^[2-6], 然而有关薇甘菊化感活性成分分离的报道并不多见. 为了进一步揭示薇甘菊这种外来入侵杂草对其他植物危害的化学机制, 综合治理薇甘菊, 达到变害为利的目的, 在生物活性跟踪下, 对薇甘菊乙醇提取物石油

醚部分中的化感活性成分进行了分离, 旨在确定薇甘菊中的主要化感活性物质, 阐明薇甘菊快速生长蔓延的生态学机理, 找出相应可行的方法消除对其他植物的危害, 综合开发利用薇甘菊, 寻找除草剂先导化合物, 开发出高效低毒的生物源除草剂等.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

薇甘菊 *Mikania micrantha* 地上部于2005年12月采自深圳市龙岗区华南农业大学生态村, 自然阴干, 粉碎, 备用. 受试植物萝卜 *Raphanus sativa*、菜心 *Brassica campestris* 种子购于广州市种子分公司门市部. 水稻 *Oryza sativa* 种子由华南农业大学农学院提供.

收稿日期: 2007-12-07

作者简介: 李拥军 (1980—), 男, 硕士; 通讯作者: 谷文祥 (1954—), 男, 教授, E-mail: wenxgu@scau.edu.cn

基金项目: 华南农业大学新学科扶助基金 (2003C20504)

$\varphi = 95\%$ 乙醇、磷酸、石油醚、乙酸乙酯、二氯甲烷、乙醚、丙酮和羧甲基纤维素钠(CMC)均为市售分析纯. 薄层层析硅胶(GF254)、柱层析硅胶(200 ~ 300 目)购自青岛海洋化工厂.

1.2 仪器设备

MFB-595 显微熔点测定仪, 温度计未校正. Perkin-Elmer-577 型红外光谱仪(KBr). QP5050A GC/MS 色质联用质谱仪\Finnigan-4510 型质谱仪. DRX-400 型核磁共振仪.

1.3 试验方法

1.3.1 化感物质的生物活性测定方法 采用“小杯滤纸片”法测定化感物质的生物活性^[7]. 将含有化感物质的溶液 2.5 mL 放入杯中, 待溶剂挥干后, 加入 $\varphi = 0.1\%$ 的土温-20(助溶作用)水溶液 2.5 mL, 在滤纸上放入刚发芽(露白)的受试植物种子 10 粒, 室温培养, 白天温度 26 ~ 30 °C, 夜间 20 ~ 25 °C. 每

处理设 3 个重复, 以清水作对照. 培养期间适当补充水分, 5 d 后测量幼苗的苗高和根长.

1.3.2 化感活性成分的分离方法 薇甘菊茎叶干粉 5 kg, 用 $\varphi = 95\%$ 的乙醇 15 kg 在 60 °C 下温浸 5 次, 每次 3 d. 过滤, 合并浸提液, 减压浓缩得浸膏 695 g. 将浸膏拌少量硅胶, 1 000 mL 石油醚浸提 3 次, 每次 1.5 h, 抽滤, 滤液合并, 进行生物活性测定, 显示对受试植物幼苗生长具有强烈的抑制作用, 浓缩滤液得浸膏 81.5 g. 将浸膏进行硅胶柱层析(石油醚/乙酸乙酯为淋洗剂)得到 A₁、A₂、A₃、A₄、A₅ 和 A₆ 6 个组分, 分别再次进行生物活性测定, 取其中对受试植物抑制作用最强的 2 个组分(A₃ 和 A₅)进一步柱层析, 石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱, 洗脱部分生物活性测试, 取对受试植物抑制作用最强的组分再次分别进行柱层析, 直至获得单体化合物(图 1).

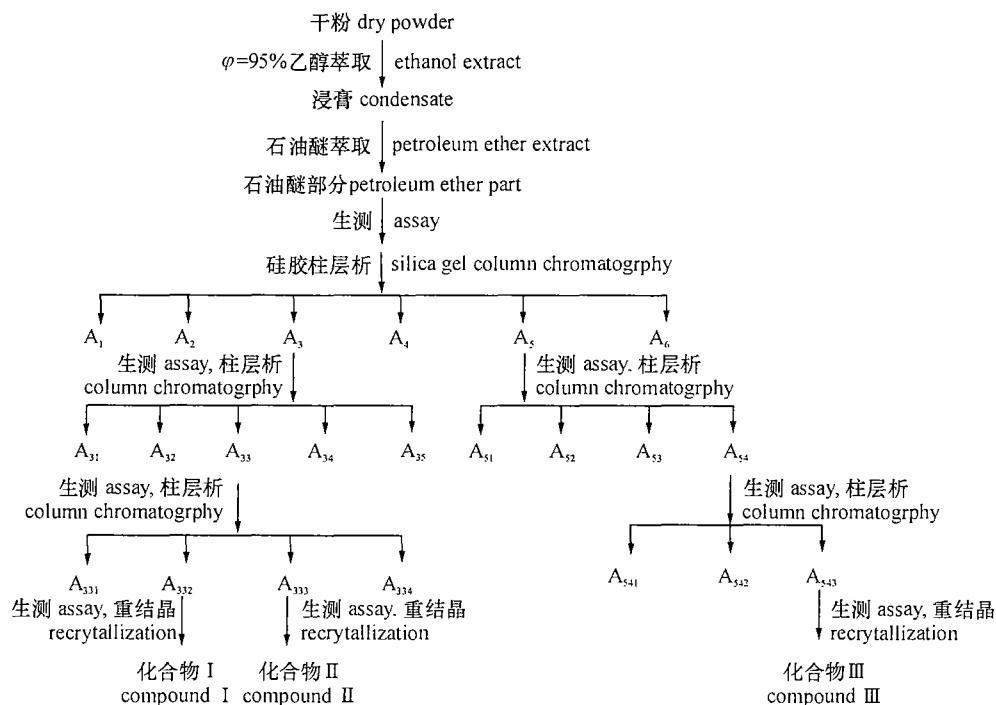


图 1 薇甘菊化感活性化合物的分离途径

Fig. 1 Isolation of allelochemicals of *Mikania micrantha*

1.3.3 数据分析与处理方法 利用化感作用效应指数(RI)进行活性跟踪^[8], $RI = 1 - C/T$ ($T \geq C$ 时)或 $RI = T/C - 1$ ($T < C$ 时). 其中 C 为对照值, T 为处理值. $RI > 0$ 为促进作用, $RI < 0$ 为抑制作用. RI 绝对值的大小与作用强度一致. 按文献[7]方法测定分离物质对 3 种受体植物的化感作用. 按下式计算幼苗的相对苗高和相对根长:

相对苗高(或根长) = 处理苗高(或根长)/对照

苗高(或根长) $\times 100\%$.

试验结果进行 Duncan's 分析.

2 结果与分析

2.1 薇甘菊分离各组分的化感活性

薇甘菊石油醚提取部分各分离组分的 RI 值如表 1 所示. 在第 1 次柱层析所得各组分 A₁ ~ A₆ 中, A₃ 和 A₅ 的化感作用效应指数均小于 -0.500, 抑制

作用达到显著水平,取这2个组分进一步进行柱层析,分别得到组分 $A_{31} \sim A_{35}$ 和 $A_{51} \sim A_{54}$,其中 A_{33} 和 A_{54} 的 RI 值分别为 -0.655 和 -0.741 ,此2组分均具有显著的抑制作用,分别对 A_{33} 和 A_{54} 进行进一步分离,其中 A_{33} 组分分离得到的 A_{332} 和 A_{333} 组分,重结晶后得到化合物 I 和 II;从 A_{54} 组分得到化合物 III.

表1 薇甘菊分离组分的化感作用效应指数 (RI)^[1]

Tab.1 Allelopathic effect index (RI) of different proportions of *Mikania micrantha*

组分 proportions	RI	组分 proportions	RI
A_1	0.068	A_{51}	0.159
A_2	0.048	A_{52}	-0.106
A_3	-0.673	A_{53}	-0.185
A_4	-0.303	A_{54}	-0.741
A_5	-0.563	A_{331}	-0.173
A_6	-0.167	A_{332}	-0.596
A_{31}	0.093	A_{333}	-0.497
A_{32}	-0.118	A_{334}	-0.089
A_{33}	-0.655	A_{541}	-0.261
A_{34}	-0.286	A_{542}	-0.158
A_{35}	-0.194	A_{543}	-0.796

1)表中 RI 值为萝卜、菜心和水稻3种受试植物苗高和根长2个测试项目 RI 值的平均值

2.2 分离化感物质的结构鉴定

化合物 I:104 mg,淡黄色粉末,熔点 (m. p.) $178 \sim 181^\circ\text{C}$. IR (KBr)/ cm^{-1} : 3 434 ($-\text{OH}$), 2 942、1 379 ($-\text{CH}_3$), 2 869、1 454 ($-\text{CH}_2-$), 1 639 ($\text{C}=\text{C}$), 1 043 ($\text{C}-\text{O}$). EI-MS (m/z): 426 (M^+), 411 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$), 408, 393, 218 (基峰), 208, 203, 189, 133 等系列三萜碎片峰. $^{13}\text{CNMR}$ (CDCl_3) δ : 38.9, 27.4, 79.1, 38.3, 55.4, 18.54, 33.1, 40.2, 47.9, 37.3, 23.5, 124.6, 139.7, 41.8, 28.9, 26.8, 34.5, 59.2, 59.2, 39.8, 31.4, 41.0, 28.2, 15.8, 16.3, 23.5, 28.3, 17.7, 21.6. 根据分析测试数据与文献[9]对照,确定化合物 I 为 α -香树脂醇(α -amyrin,图 2a).

化合物 II:1.5 g,白色针晶(CH_2Cl_2), m. p. $158 \sim 160^\circ\text{C}$. IR (KBr)/ cm^{-1} : 3 410, 2 936, 2 862, 1 634, 1 460, 1 375, 1 056, 965. EI-MS (m/z): 412 (M^+), 397 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$), 394 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$), 379 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{H}_2\text{O}$), 369 ($\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_7$), 300 [$\text{M}^+ - \text{CH}_2=\text{CHCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$], 273 [$\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$], 255 [$\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$,

$-\text{H}_2\text{O}$], 112 [$\text{CH}_2=\text{CHCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$].

$^1\text{HNMR}$ (CDCl_3) δ : 0.68 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, $-\text{CH}_3$), 0.79 (6H, d, $J = 6.8$ Hz, $2-\text{CH}_3$), 1.00 (6H, s, $2-\text{CH}_3$), 1.14 (3H, d, $J = 9.6$ Hz, $-\text{CH}_3$), 提示分子中具有2个甲基,其中 0.79 (6H, d, $J = 6.8$ Hz, $2-\text{CH}_3$) 表明异丙基的存在, 3.51 (1H, m, C_3-H), 为含氧碳上质子, 5.00 (1H, m, $\text{C}_{23}-\text{H}$), 5.14 (1H, m, $\text{C}_{22}-\text{H}$), 为烯碳上 H, 5.34 (1H, s, $-\text{OH}$) 为羟基 H, 综合分析该化合物的 $^1\text{HNMR}$, 显示该化合物为典型的甾醇类化合物. $^{13}\text{CNMR}$ (CDCl_3) δ : 140.90, 138.50, 129.40, 121.90, 70.25, 56.53, 55.87, 50.62, 50.13, 42.37, 42.03, 40.33, 39.38, 37.17, 36.32, 31.79, 31.57, 31.50, 31.26, 28.12, 24.71, 23.94, 21.04, 20.77, 20.60, 19.10, 18.90, 11.92, 11.80. 其中 δ 值 140.90、121.90、138.50、129.40 为具有甾醇骨架的化合物的特征双键信号, 71.9 为含氧碳的信号. 结合熔点、红外、质谱、核磁共振和氢谱综合分析,并与文献[10,12-13]数据对照,确定化合物 II 为豆甾醇 ($\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$, stigmasterol, 图 2b).

化合物 III:84 mg,淡黄色针晶(丙酮), m. p. $170 \sim 172^\circ\text{C}$. IR (KBr)/ cm^{-1} : 3 436, 3 016 $\sim$ 2 500, 1 691, 1 620, 1 600, 1 516, 1 466, 1 379, 1 035, 972. EI-MS (m/z): 194 (M^+), 179 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$), 177 ($\text{M}^+ - \text{OH}$), 161 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{H}_2\text{O}$), 150 ($\text{M}^+ - \text{CO}_2$), 133 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{H}_2\text{O} - \text{CO}$), 105 (133 - CO), 77 (105 - CO). $^1\text{HNMR}$ (CD_3COCD_3) δ : 3.82 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 6.38 (1H, d, $J = 16.2$ Hz), 7.46 (1H, d, $J = 15.9$ Hz), 7.03 (1H, d, $J = 8.0, 2.1$ Hz), 6.80 (1H, dd, $J = 8.1$ Hz), 7.10 (1H, d, $J = 2.1$ Hz) 和 7.03 (1H, d, $J = 8.0, 2.1$ Hz). $^{13}\text{CNMR}$ (CD_3COCD_3) δ : 168.3, 148.98, 147.80, 144.30, 125.70, 122.68, 115.54, 115.44, 111.03, 56.00. 结合波谱数据分析,与文献[11,13-14]中阿魏酸波谱学数据对照基本一致,确定化合物 III 为 3-甲氧基-4-羟基-桂皮酸,即阿魏酸 (ferulic acid, 图 2c).

2.3 α -香树脂醇、豆甾醇和阿魏酸的化感作用

在4种质量浓度下, α -香树脂醇对萝卜、菜心和水稻的根长和苗高都有抑制作用,其中在 1.00、0.50 和 0.25 mg/mL 3 种质量浓度时,对3种受试植物的2个测试项的抑制作用都达到了显著水平(表 2). 2 种受试植物的根部比地上部对 α -香树脂醇的化感作用更敏感.

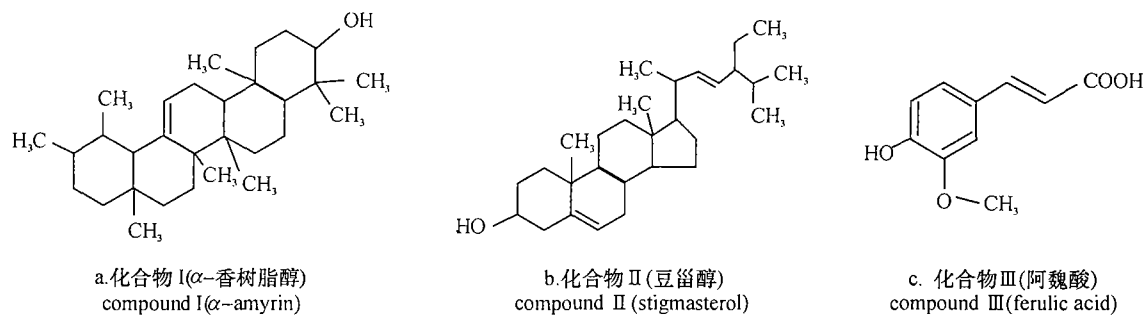


图2 化合物 I、II、III 的分子结构

Fig. 2 Molecule structure of compounds of I , II , III

表2 3种化合物对萝卜、菜心和水稻幼苗生长的影响¹⁾

Tab.2 Effect of three compounds with different mass concentrations on seedling growth of *Raphanus sativa*, *Brassica campestris* and *Oryza sativa* %

化合物 compound	ρ/(mg · mL ⁻¹)	萝卜 <i>Raphanus sativa</i>		菜心 <i>Brassica campestris</i>		水稻 <i>Oryza sativa</i>	
		相对根长	相对苗高	相对根长	相对苗高	相对根长	相对苗高
		relative root length	relative shoot height	relative root length	relative shoot height	relative root length	relative shoot height
α-香树脂醇 α-amyrin	1.00	58.6c	61.9c	50.9d	61.4b	57.4d	49.2d
	0.50	67.5bc	67.7bc	64.5c	68.3b	67.0c	75.4c
	0.25	79.7b	77.6b	79.4b	88.1ab	81.2b	82.8b
	0.01	98.2a	95.3a	91.7ab	93.4a	95.9a	96.7a
	对照 control	100.0a	100.0a	100.0a	100.0a	100.0a	100.0a
豆甾醇 stigmasterol	1.00	85.2b	76.5c	85.9c	60.7c	65.3c	58.9c
	0.50	88.2b	77.4c	92.1bc	79.9b	65.3c	65.1c
	0.25	98.7a	88.2b	94.6b	82.2b	82.9b	81.4b
	0.01	100.3a	98.3a	101.7a	84.0b	88.4b	89.1b
	对照 control	100.0a	100.0a	100.0a	100.0a	100.0a	100.0a
阿魏酸 ferulic acid	1.00	26.0d	27.2d	35.6d	28.4c	29.1d	25.4c
	0.50	55.9c	46.8c	72.7c	64.1b	64.0c	52.5b
	0.25	72.6b	70.1b	83.7b	89.9ab	84.2b	83.1a
	0.01	97.4a	97.9a	95.5a	105.6a	101.5a	95.8a
	对照 control	100.0a	100.0a	100.0a	100.0a	100.0a	100.0a

1)表中数据为3个重复的平均数;同种化合物同列数据后面字母相同者表示差异不显著(Duncan's法, P=0.05)

用不同质量浓度豆甾醇处理受试植物幼苗,结果(表2)发现,在4种质量浓度下,豆甾醇对萝卜苗高都有抑制作用,其中在1.00、0.50和0.25 mg/mL 3种质量浓度下,抑制作用达到显著水平,而在4个质量浓度下对萝卜根长都没有表现出较强的抑制作用.在对菜心的测试中,4种质量浓度对苗高的抑制作用均达到了显著水平,对根长的影响则只有在高质量浓度时,抑制作用才达到显著水平,而低质量浓度(0.01 mg/mL)对根长反而有促进作用,表现出化感作用的典型特征——低促高抑现象.同时地上部比根部对豆甾醇的化感作用更敏感.

用不同浓度阿魏酸处理受试幼苗,结果(表2)

发现,在1.00、0.50和0.25 mg/mL 3种质量浓度下,对3种受试植物的2个测试项的抑制作用都达到了显著水平.而在低质量浓度(0.01 mg/mL)下,对菜心苗高和水稻根长反而有促进作用,表现出化感作用的典型特征——低促高抑效应.

3 讨论与结论

植物在生存繁衍过程中,合成次生物质以避免动物的侵袭,增强与其他植物竞争的能力,这是生物在其协同进化过程中获得的一种竞争机制,它们不仅能抑制植物群落生长发育,也能驱避昆虫和影响昆虫行为^[15-16].前人研究表明,薇甘菊中化感次

生物质的存在是薇甘菊在生态系统中能成为优势种并迅速蔓延的重要原因之一^[1-5]。

从薇甘菊地上部分中分离得到的化合物均具有较强的化感活性,从而更进一步证实,薇甘菊杀死其他植物的作用机制不仅仅是通过覆盖,使其植物失去光合作用导致死亡,而且也通过释放化感物质,抑制和危害其他植物生长,表现出争取生存机会的生态功能。分离物阿魏酸是一种具有强烈活性的化感物质,在薇甘菊的化学竞争机制中起到了重要的作用。

本研究从薇甘菊化感活性部分分离获得了3个活性化合物,并鉴定了它们的结构,研究了单体化合物对萝卜、菜心和水稻的化感活性,初步确定了薇甘菊中的主要化感活性物质为 α -香树脂醇、豆甾醇和阿魏酸,对于阐明薇甘菊快速生长蔓延机理,采取相应方法消除薇甘菊对其他植物的危害,综合开发利用薇甘菊,寻找除草剂先导化合物,开发出良好的生物源除草剂等提供了重要的理论依据。

参考文献:

- [1] 黄忠良,曹洪麟,梁晓东,等.不同生境和森林内薇甘菊的生存与危害状况[J].热带亚热带植物学报,2000,8(2):131-138.
- [2] FACEY P C, PASCOE K O, PORTER R B, et al. Investigation of plants used in jamaican folk medicine for antibacterial activity[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1999, 51(12): 1455-1460.
- [3] 邵华,彭少麟,张弛,等.薇甘菊的化感作用研究[J].生态学杂志,2003,22(5):62-65.
- [4] 庞雄飞,赵辉,孔垂华,等.薇甘菊挥发油的化感潜力[J].应用生态学报,2002,13(10):1300-1302.
- [5] WEI Xiao-yi, HUANG Hong-juan, WU Ping, et al. Phenolic constituents from *Mikania micrantha* [J]. Biochem System Eco, 2004 (32):1091-1096.
- [6] 梁斌,袁亚莉,谷文祥,等.薇甘菊化感作用的初步研究[J].杂草科学,2006(1):21-23.
- [7] 曾任森.化感研究中的生测方法[J].应用生态学报,1999,10(1):123-126.
- [8] WILLIAMSON G B. Bioassays for allelopathy: measuring treatment responses with independent controls[J]. J Chem Eco, 1988, 14(1): 181-187.
- [9] 阮金兰,纪琦,陈桂先,等.大叶牛奶菜化学成分研究: II [J]. 同济医科大学学报,1990,19(5):344-346.
- [10] 封士兰,何兰,王敏.百合花化学成分的研究[J].中国中药杂志,1994,19(10):611-612.
- [11] 张国升,李前荣,尹浩,等.气相色谱-飞行时间质谱法快速测定和鉴定芦根中阿魏酸的含量与结构[J].中草药,2005,36(3):333-335.
- [12] 冯长根,李琼.香青兰化学成分的研究[J].中成药,2006,28(1):94-98.
- [13] 傅宏征,楼之岑,蔡少青,等.毛梗荳化学成分的研究: I [J]. 中国药理学杂志,1998,33(3):140-142.
- [14] CHARLES J K, RICHARD C H, MARVIN C. The polyphenolic acid of lithospermum ruderales: II. Carbon-13 nuclear magnetic resonance of lithospermic rosmarinic acid [J]. J Org Chem, 1976, 41(3):449.
- [15] 何衍彪,何庭玉,谷文祥,等.苦槛蓝挥发油对小菜蛾的生物活性[J].应用生态学报,2004,15(1):149-152.
- [16] 谷文祥,何衍彪,何庭玉,等.苦槛蓝提取物对小菜蛾的生物活性[J].应用生态学报,2004,15(7):1171-1173.

【责任编辑 李晓卉】